# Système de test ANA HEp-2

IVD

REF FA2401

CE

## UTILISATION PRÉVUE

Le système de test ZEUS IFA ANA HEp-2 est un essai préstandardisé de détection qualitative et semi-quantitative de détection d'anticorps antinucléaires. Ce test a pour but d'aider à diagnostiquer les cas de LES (lupus érythémateux systémique) et à différencier les autres désordres semblable de tissus conjonctifs. Il a été conçu pour un usage diagnostique *in vitro*.

## SIGNIFICATION ET CONTEXTE

L'immunofluorescence indirecte est couramment utilisée pour détecter la présence d'anticorps antinucléaires (ANA en anglais) dans le sérum sanguin de patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) et d'autres désordres des tissus conjonctifs cliniquement semblables (1-5). En outre, les ANA sont associés à divers syndromes de lupus induits par l'usage de médicaments (6-7) qui reproduisent cliniquement une forme spontanée de LES. L'immunofluorescence indirecte a été adaptée aux tests de détection d'ANA par plusieurs chercheurs (8-9) selon les méthodes fondamentales originalement décrites par Coons (10). Les ANA sont principalement composés d'anticorps IgG, mais des ANA IgA et IgM peuvent également être détectés (11). Il est maintenant reconnu que plusieurs sources de matériel nucléaire peuvent être utilisées comme substrat pour des tests d'ANA. Même si la plupart des recherches originales sur des ANA ont été réalisées avec des substrats à base de sections de tissu de foie ou de rein provenant de rats ou de souris, l'utilisation de substrats à base de cultures cellulaires de tissus embryonnaires humains ou animaux a permis de réaliser des tests d'ANA avec des résultats fiables et faciles à interpréter. La lignée cellulaire HEp-2 est un substrat recommandé pour la détection d'anticorps centromères, dont la présence est hautement indicative de la variante CREST de sclérose systémique progressive (27). Il existe plusieurs motifs d'immunofluorescence nucléaire et cytoplasmique. Ces motifs et les bases sur lesquelles ils reposent sont décrits ci-dessous :

**Homogène** – Les motifs de marquage homogènes ou diffus du noyau correspondent à des anticorps d'histones d'ADN natif (ADNn) et/ou de désoxyribonucléoprotéine (DNP) (12, 13). Les chromosomes de cellules mitotiques (cellules en mitose) sont d'importants indicateurs de motif homogène car ils produisent un marquage sous forme de masses irrégulières avec un marquage plus intense sur les rebords extérieurs.

**Motif tacheté** – Le motif tacheté est le plus fréquemment observé en détection d'ANA. Un motif tacheté uniforme peut être observé chez des anticorps centromères d'anticorps de cellules qui ne sont pas en mitose). Un motif tacheté en grappes peut être observé chez des anticorps de protéines n-RNP, Sm et SSB/La.

1. *Motif en taches fines, chromosome négatif :* Très nombreux petits points de fluorescence de grandeur uniforme répartis uniformément dans le noyau. Les nucléoles apparaissent généralement non marqués. Les cellules mitotiques peuvent présenter quelques taches dans leur cytoplasme, mais les chromosomes seront négatifs.
2. *Motif en taches alignées, chromosome négatif :* Les points de fluorescence de taille moyenne seront éparpillés dans le noyau avec des marges cellulaires distinctes. Des points de fluorescence plus grands peuvent également être observés, mais ils sont trop nombreux et de taille trop variable pour constituer un motif nucléaire. Les chromosomes des cellules mitotiques seront négatifs.
3. *Taches espacées, chromosome positif (spécificité centromère) :* Les chromosomes seront positifs dans les cellules mitotiques ; en fait, les points espacés seront groupés uniquement dans la masse chromosomique, démontrant clairement les divers stages de mitose. Le motif centromère a été reconnu comme étant associé au syndrome de CREST, qui constitue une variante moins puissante de sclérose systémique progressive (SSP). Le motif centromère se présentera sous forme de taches fluorescentes uniformes et espacées, réparties uniformément dans le noyau. Les cellules mitotiques seront positives, avec des grappes centromères dans les chromosomes selon différentes configurations dépendant du stade mitotique. Harmon, et al (17) ont démontré que des échantillons de sérum sanguin contenant des anti-SSA/Ro hautement monospécifiques produisaient un motif de détection d'ANA par IF sous forme de taches nucléaires espacées, sur une grande variété de cellules humaines et de noyaux de tumeurs. Ces échantillons de sérum sanguin avec anti-SSA/Ro monospécifiques ont produit très peu de taches cytoplasmiques sur des substrats cellulaires. Un motif distinct de 3-10 grandes taches variables dans le noyau a déjà été décrit. Ces patients présentant de grandes taches variables souffraient de syndromes rhumatismaux se caractérisant par des anticorps antihistones IgM H-3 (18).

**Motif nucléaire** – Le motif nucléaire se présente sous forme de marquage homogène ou tacheté des nucléoles. Ce motif est souvent associé avec une fluorescence homogène et terne du reste du noyau. Les chromosomes des cellules mitotiques seront négatifs. Le motif nucléaire suggère la présence d'anticorps d'ARN 4-6S. La fluorescence nucléaire peut être uniforme, agrégée (en grappes) ou tachetée selon l'antigène auquel réagit l'anticorps. Les anticorps antinucléaires sont observés principalement dans le sérum de patients souffrant de sclérodermie, de lupus érythémateux systémique (LES), de syndrome de Sjögren ou du phénomène de Raymond (19).

**Périphérique (couronne)** – Le marquage du noyau est prédominant en périphérie. Les chromosomes des cellules mitotiques sont marqués sous forme de masses irrégulières avec un marquage plus intense sur les rebords extérieurs. Ce motif est souvent observé sur des anticorps d'ADNn (3, 14-16). Si les chromosomes des cellules mitotiques sont négatifs, le motif suggère alors la présence d'auto-anticorps de membrane nucléaire et non d'ADNn, ce qui ne correspond pas à un motif périphérique (voir l'interprétation de membrane nucléaire ci-dessous).

**Autres motifs**

1. *Motif en fibres fusiformes, chromosome positif :* Le motif en fibres fusiformes est caractéristique de cellule en mitose où seulement la partie fusiforme est fluorescente. Ce motif a souvent une apparence de « toile d'araignée » s'étalant du centriole vers les centromères. Ce motif suggère la présence d'auto-anticorps de microtubules et sans signification est incertaine. Cependant, une association entre le motif en fibres fusiformes et le syndrome du tunnel carpien a été suggérée.
2. *Motif mi-corps :* Le motif mi-corps correspond à une zone densément marquée près du blastocèle de cellules télophases, c'est-à-dire où les deux cellules filles se séparent. La signification clinique de ce motif est inconnue. Cependant, ce motif a été reconnu chez certains patients souffrant de sclérose systémique.
3. *Motif centriolaire :* Le motif centriolaire est caractérisé par deux points distincts de fluorescence dans le noyau des cellules mitotiques ou par un point distinct de fluorescence dans la cellule au repos. La signification de ce motif est inconnue, mais il a été observé chez des patients souffrant de SSP.
4. *Motif d'antigène nucléaire cellulaire proliférant (ANCP) :* Le motif d'antigène nucléaire cellulaire proliférant est observé sous forme de taches nucléaires fines ou grosses dans 30-60 % des cellules en interphase, avec un marquage négatif de la région chromosomique des celles mitotiques. Le motif ANCP est très caractéristique des patients souffrant de LES et n'a pas été détecté chez des patients souffrant d'autres maladies de tissus conjonctifs. Il a été signalé que des patients souffrant de LES ayant un motif ANCP présente un taux plus élevé de glomerulonéphrite diffuse.
5. *Membrane antinucléaire (strate nucléaire) :* Le motif de membrane antinucléaire se présente sous forme de couronne autour du noyau et ressemble au motif en couronne, sauf que le stade des chromosomes en métaphase est négatif. Cet anticorps doit être signalé car il est associé de façon reconnue à un désordre auto-immune du foie.

**Motifs cytoplasmiques**

1. *Motif mitochondrial (AMA) :* Ce motif se présente généralement avec plusieurs taches cytoplasmiques et une plus grande concentration autour du noyau. Ce motif peut être observé chez des cellules en interphase et chez des cellules mitotiques. La signification clinique du motif AMA est principalement une association avec une cirrhose biliaire primaire, particulièrement si le motif AMA est à titre élevé.

2. *Motif d'appareil de Golgi :* Le motif d'appareil de Golgi se caractérise par un marquage cytoplasmique positif se concentrant sur un côté de la région périnucléaire. Sa signification clinique est incertaine, mais des rapports publiés suggèrent une association avec le LES et le syndrome de Sjögren.
3. *Motif lysosomien :* Le motif lysosomien se pré4sente sous forme d'un petit nombre de taches espacées, observées dans le cytoplasme. Ce motif peut être observé dans le cytoplasme de cellules en interphase et de cellules mitotiques. La signification clinique est inconnue.
4. *Motif ribosomien :* Le motif ribosomien se présente généralement avec plusieurs taches cytoplasmiques et une plus grande concentration autour du noyau. Il se distingue du motif mitochondrial par des taches plus petites d'un densité plus grande. La signification de ce motif est inconnue.
5. *Motif cytosquelettique :* Le motif cytosquelettique se caractérise par une « toile d'araignée » distinctive ou par une apparence fibreuse dans l'ensemble de la cellule. On a signalé qu'il pouvait être associé à un désordre auto-immune du foie (anticorps anti-muscle lisse).

**ANA négatif**

Un auto-anticorps de SSA/Ro est fréquemment présent dans un sous-ensemble clinique de lupus appelé « lupus érythémateux systémique cutané » (LESC). Plusieurs patients souffrant de LESC ont été faussement diagnostiqués comme ayant un lupus à « ANA négatifs ». Plusieurs de ces patients avec un soi-disant lupus érythémateux à « ANA négatifs » présenteront un résultat d'immunofluorescence à ANA positifs sur un substrat de cellules HEp-2 contenant l'antigène SSA/Ro (20). Les anticorps anti-SSA/Ro peuvent être présents en l'absence d'ANA classiques, avec un LES observé chez des personnes ayant une déficience génétique en C4 et parfois aussi d'autres déficiences complémentaires (21, 22). En outre, cette déficience en C4 peut être associée à une sensibilité accrue au développement de LES après un traitement à base d'hydralazine. Si ces patients sont des femmes, elles présentent un risque élevé d'avoir des enfants ayant un bloc cardiaque congénital ou souffrant de dermatite lupique (26). Même si le niveau d'ANA n'est pas en corrélation avec le développement clinique de l'état d'une maladie auto-immune particulière (6), les divers motifs de marquage nucléaire peuvent être associés à des états de maladie spécifiques (3, 16 et 28-31).

Le tableau suivant résume les divers auto-anticorps mentionnés ci-dessus pouvant être associés à des maladies:

**Tableau 1**

| Anticorps | État de la maladie | Fréquence relative de détection d'anticorps (%) |
|---|---|---|
| Anti-Jo-1 | Myosite | 25 - 44% (18) |
| Anti-Sm | LES | 30 * |
| Anti-RNP | Syndrome de chevauchement (MCTD), LES | 100** et > 40, respectivement |
| Anti-SSA/Ro | LES, syndrome de Sjögren | 15 et 30 - 40, respectivement |
| Anti-SSB/La | LES, syndrome de Sjögren | 15 et 60 - 70, respectivement |
| Anti-Scl-70 | sclérose systémique | 20 - 28 * |

* Hautement spécifique ** Hautement spécifique lorsque présent seul en titre élevé

## PRINCIPE DU TEST

Le système de test ZEUS IFA ANA HEp-2 a été conçu pour la détection d'anticorps antinucléaires (ANA en anglais) circulant dans un échantillon de sérum sanguin humain. L'analyse utilise un substrat de culture cellulaire et de l'immunoglobuline de chèvre antihumaine ajustée pour un usage optimal, sans marquage d'arrière-plan non spécifique. La réaction se fait en deux temps :

1. Dans un premier temps d'incubation de l'échantillon, l'ANA présent dans l'échantillon du patient peut coller au substrat cellulaire, formant un complexe antigène-anticorps. Les autres composants sériques sont subséquemment lavés.
2. Dans un deuxième temps d'incubation du conjugué, l'immunoglobuline antihumaine marquée avec du FITC peut réagir avec le l'immunoglobuline humaine ayant adhérée au substrat durant l'incubation de l'échantillon. Cette réaction formera un complexe antigène-anticorps-conjugué stable à l'endroit où l'anticorps initial du patient a adhéré au substrat cellulaire. Le surplus de conjugué est subséquemment lavé. Les résultats de l'analyse peuvent être visualisés avec un microscope fluorescent correctement équipé. Toute réaction positive sera détectée par un marquage fluorescent vert pomme dans la cellule. Si l'échantillon ne contenait aucun ANA spécifique, aucun marquage nucléaire distinct ne sera visible au niveau de la cellule.

## COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

**Matériel inclus :**

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement.

**REMARQUE : Le conjugué et les solutions de contrôle contiennent une combinaison de Procline (0,05 % v/v) et d'azoture de sodium (<0,1 % volume d'eau) comme agents de conservation. Le SAVe Diluent® contient de l'azoture de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau).**

| | |
|---|---|
| • • • | 1. Lames de substrat ANA HEp-2 : Dix lames de 12 puits avec un tampon absorbant et un sachet de dessiccation. |
| CONJ | 2. Conjugué : Immunoglobuline de chèvre antihumaine (polyvalente) marquée avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Contient une solution tampon de phosphate avec BSA et colorant de contraste. Un flacon de 3,5 ml avec bouchon ambre. Prêt à l'emploi. |
| CONTROL + | 3. Contrôle positif (sérum humain) : Produira un marquage homogène positif couleur vert-pomme du noyau humain. Une ampoule de 0,5 ml avec bouchon rouge. Prêt à l'emploi. |
| CONTROL - | 4. Contrôle négatif (sérum humain) : Ne produira aucun marquage nucléaire détectable. Une ampoule de 0,5 ml avec bouchon vert. Prêt à l'emploi. |
| DIL SPE | 5. SAVe Diluent® : Deux flacons de 30 ml à bouchon vert contenant une solution de tampon phosphate salin. Prêt à l'emploi. **REMARQUE : La solution SAVe Diluent® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.** |
| BUF PBS | 6. Tampon phosphate salin (PBS) : pH 7,2 ± 0,2. Pour préparer le tampon, vider le contenu de chaque sachet de tampon dans un litre d'eau distillée ou déionisée. Mélanger jusqu'à ce que tous les sels soient bien dissous. Quatre sachets, suffisants pour préparer 4 litres. |
| MNTMED | 7. Support de montage (glycérol tamponné) : Deux ampoules de 3,0 ml avec bec verseur et bouchon blanc. |

**REMARQUES :**

1. **Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ZEUS IFA, tant que les numéros de produits sont identiques : SAVe Diluent® (produit nº FA005CC), support de montage (produit nº FA0009S) et PBS (produit nº 0008S).**
2. **Le système de test contient également :**
   a. **Une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.**
   b. **Un CD contenant toute la documentation du produit ZEUS IFA, dont le mode d'emploi.**

## PRÉCAUTIONS

1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.

2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. Les puits de lame ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, les lames doivent être considérées comme des **matériaux biologiques dangereux** et être manipulées en conséquence.
4. Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (20).
5. Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. **Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20–25 ºC) avant de commencer le test.** Replacer immédiatement les réactifs inutilisés dans leur récipient et observer les consignes de stockage.
6. Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution PBS résiduelle (par absorption) avant d'ajouter le conjugué. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
7. La solution SAVe Diluent®, le conjugué et les solutions de contrôle contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azoture de sodium. Cet agent de conservation peut être toxique s'il est ingéré.
8. La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
9. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
10. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
11. Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
12. Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
13. Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
14. Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
15. Laisser le paquet de lames arriver à température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice, afin de protéger les puits et le tampon absorbant de toute condensation.
16. Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
17. Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.
18. Ne pas appliquer de pression sur l'enveloppe de lame. Une telle opération risquerait d'endommager le substrat.
19. Les composants de ce système de test sont assemblés pour procurer une sensibilité et une reproductibilité optimale. Ne pas remplacer les réactifs par des produits d'autres fabricants. Lire attentivement la notice dans l'emballage.
20. Composants non ouvert/ouvert sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette, dans la mesure où les conditions de stockage recommandées sont rigoureusement respectées. Ne pas utiliser après la date de péremption. Ne pas congeler.
21. Le colorant de contraste bleu Evans est potentiellement cancérigène. En cas de contact cutané, rincer abondamment sous l'eau. Jeter les résidus conformément aux réglementations locales en vigueur.
22. Ne pas laisser les lames sécher durant la procédure. Selon les conditions ambiantes du laboratoire, il est possible qu'il soit nécessaire de placer les lames dans une pièce humide durant les périodes d'incubation.

## MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Petites pipettes sérologiques Pasteur capillaires ou automatiques.
2. Embouts de pipettes jetables.
3. Petits tubes d'essai de 13 x 100 mm (ou de dimensions comparables).
4. Supports pour tubes d'essai.
5. Plateau de marquage : Un grand plateau de marquage avec un petit dispositif de mélange magnétique sera idéal pour laver les lames entre les incubations.
6. Bandes de recouvrement, 24 x 60 mm, épaisseur nº 1.
7. Eau distillée ou déionisée.
8. Microscope à fluorescence correctement équipé.
9. Cylindre gradué d'un litre.
10. Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
11. Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique - 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

Les systèmes de filtres suivants (ou des systèmes équivalents) sont satisfaisants pour un usage routinier avec des assemblages de microscopie sur fond noir avec lumière transmise ou incidente :

| **Lumière transmise** | | |
|---|---|---|
| Source lumineuse : Vapeur de mercure 200 W ou 50 W | | |
| Filtre d'excitation | Filtre barrière | Filtre de suppression rouge |
| KP490 | K510 ou K530 | BG38 |
| BG12 | K510 ou K530 | BG38 |
| FITC | K520 | BG38 |
| Source lumineuse : Tungstène – Halogène 100W | | |
| KP490 | K510 ou K530 | BG38 |

| **Lumière incidente** | | | |
|---|---|---|---|
| Source lumineuse : Vapeur de mercure 200, 100, 50 W | | | |
| Filtre d'excitation | Miroir dichroïque | Filtre barrière | Filtre de suppression rouge |
| KP500 | TK510 | K510 or K530 | BG38 |
| FITC | TK510 | K530 | BG38 |
| Source lumineuse : Tungstène – Halogène 50 et 100 W | | | |
| KP500 | TK510 | K510 ou K530 | BG38 |
| FITC | TK510 | K530 | BG38 |

## PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

1. ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infectious Diseases* ». Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
2. Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (30, 31). Ne pas ajouter d'anticoagulant ni d'agent de conservation. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.
3. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 – 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (38).

## CONDITIONS DE STOCKAGE

| | |
|---|---|
| 2°C – 8°C | Système de test non ouvert. |
| | Support de montage, conjugué, SAVe Diluent®, lames, contrôles négatifs et positifs, colorant de contraste bleu Evans. |
| | PBS réhydraté (stable 30 jours). |
| 2°C – 25°C | Paquets de tampon phosphate salin (PBS). |

## PROCÉDURE D'ESSAI

1. Sortir les lames de leur lieu de stockage réfrigéré et laisser les lames se réchauffer à température ambiante (20 – 25 °C). Déchirer l'enveloppe protectrice et sortir les lames. **Ne pas appliquer de pression sur les côtés plats de l'enveloppe protectrice.**
2. Identifier chaque puits selon le sérum de patient et les contrôles. **REMARQUE : Les contrôles doivent être utilisés non dilués.** Préparer une dilution 1:40 (p. ex. 10 µl de sérum + 200 µl de SAVe Diluent® ou du tampon PBS) pour chaque patient. **La solution SAVe Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.**
   **Options de dilution :**
   a. S'ils le désirent, les utilisateurs peuvent préparer les dilutions initiales d'échantillon avec du PBS, ou Zorba-NS (Zorba-NS est disponible séparément Ordre Numéro de produit FA025 - 2, 30 ml).
   b. Les utilisateurs peuvent titrer le contrôle positif jusqu'à l'extrémité pour l'employer comme contrôle semi-quantitatif (1+ minimalement réactif). Dans un tel cas, le contrôle doit être dilué avec deux volumes de SAVe Diluent® ou du tampon PBS. Lorsque l'évaluation est réalisée par ZEUS Scientific, la dilution d'extrémité est établie et imprimée sur l'ampoule de contrôle positif (± 1 dilution). Il est important de signaler qu'à cause des variations propres à chaque laboratoire (équipement, etc.), le laboratoire doit établir son propre titre d'extrémité attendu pour chaque lot de contrôle positif.
   c. Lors du titrage des spécimens prélevés sur des patients, les dilutions initiales doivent être préparées dans du SAVe Diluent®, du tampon PBS ou du Zorba-NS et toutes les dilutions subséquentes doivent être préparées uniquement avec du SAVe Diluent® ou du tampon PBS. Les titrages ne doivent pas être préparés avec du Zorba-NS.
3. Avec un distributeur approprié (indiqué ci-dessus), distribuer 20 - 40 µl de chaque contrôle et de chaque sérum de patient dilué dans les puits appropriés.
4. Incuber les lames à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 20 - 30 minutes.
5. Rincer délicatement les lames avec du tampon PBS. **Ne pas appliquer directement un jet de PBS dans les puits d'essai.**
6. Laver les lames à deux, le temps supplémentaire, en changeant entre les lavages PBS. Les lames peuvent tremper pendant chaque lavage pendant cinq minutes. **REMARQUE: Pour ceux qui utilisent rondelles automatiques, régler la machine à laver pour laver chaque puits trois fois avec un trempage de zéro à cinq minutes.**
7. Retirez une à une les lames du tampon PBS. Inverser la lame et les puits principaux dans les trous des buvards fournis. Épongez la lame en essuyant le côté opposé avec une serviette absorbante. ATTENTION : Placer le buvard et la lame sur une surface plane et dure. L'utilisation de serviettes essuie-tout pour éponger risquerait de détruire la matrice de lames. Ne pas laisser les lames sécher durant la procédure de test.
8. Ajouter 20 - 40 µl de conjugué dans chaque puits.
9. Répéter les étapes de 4 à 7.
10. Appliquer 3 - 5 gouttes de support de montage sur chaque lame (entre les puits) et une bande de recouvrement. Support de montage doivent être ajoutés dans les deux heures suivant la fin du dernier cycle de lavage. Examiner immédiatement les lames avec un microscope à fluorescence approprié.

**REMARQUE : S'il n'est pas possible d'examiner immédiatement les lames, appliquer du vernis à ongles transparent sur la bande de recouvrement pour fermer hermétiquement les contours et ranger au réfrigérateur. Il est recommandé que les lames soient examinées le jour même du test.**

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Chaque fois qu'un essai est exécuté, un contrôle positif, un contrôle négatif et un contrôle tampon doivent être inclus.
2. Il est recommandé de lire les contrôles avant l'évaluation des échantillons du test. Si les contrôles ne sont pas conformes à la description, il est possible que les résultats soient invalides.
   a. Contrôle négatif – Caractérisé par l'absence de fluorescence spécifique et un marquage du fond rouge ou vert pâle sur toutes les cellules à cause du colorant de contraste.
   b. Contrôle positif (motif homogène) – Caractérisé par une fluorescence vert pomme. Le motif de marquage homogène est un marquage uniforme diffus de tout le noyau.
3. Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes.

**REMARQUE :**

   a. **Il est possible que du réactif non spécifique soit emprisonné. Il est important de bien laver les lames pour éviter les faux résultats positifs.**
   b. **L'intensité de la fluorescence observée peut varier selon le microscope et le système de filtre utilisé.**
   **c. Le marquage non nucléaire du substrat cellulaire utilisé peut être observé sur certains sérums humains.**

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. L'interprétation des résultats dépend du motif observé, du titre de l'anticorps et de l'âge du patient. Les personnes âgées, particulièrement les femmes, sont sujettes au développement d'anticorps à titrage faible (<1:80) en l'absence de maladie auto-immune clinique. Par contre, un titre 1:20 d'un motif significatif d'auto-anticorps chez une personne jeune peut suggérer qu'une maladie explicite se manifestera plus tard. L'expérience suggère qu'une dilution à 1:40 constitue un bon taux de dilution pour la détection d'ANA. Des résultats positifs à titre faible peuvent survenir chez des personnes apparemment saines. Par conséquent, les résultats d'ANA doivent toujours être interprétés selon l'ensemble des informations cliniques du patient.
2. Un titre inférieur à 1:40 est considéré négatif.

3. Test positif : Une réaction positive correspond à la présence d'un motif de marquage nucléaire vert pomme observé avec une dilution de 1:40 basé sur une échelle d'intensité de marquage de 1+ à 4+. 1+ correspond à une réaction faible et 4+ à une réaction forte. Tous les sérums positifs à 1:40 doivent être titrés à la dilution d'extrémité. cette opération est réalisée en faisant des dilutions en série de 1:40, 1:80, 1:160, etc. avec uniquement des résultats positifs. Le titre d'extrémité est le taux de dilution le plus élevé produisant une réaction positive 1+.
4. Des motifs homogènes avec une accentuation périphérique sont fréquemment rencontrés dans le sérum de patients souffrant de LES.

| | **Maladie la plus fréquemment découverte** | **Référence** |
|---|---|---|
| Homogène :<br>Titre élevé<br>Titre faible | <br>LES<br>Arthrite rhumatoïde et autres maladies | <br>(3, 8, 9 et 16)<br>(1) |
| Centromère | Syndrome de CREST (variante de SSP) | (27) |
| Tacheté | Sclérodermie, syndrome de Raymond, syndrome de Sjögren, maladie mixte de tissus conjonctifs | (34 - 36) |
| Nucléolaire | Sclérodermie | (37) |
| Périphérique | LES | (2, 8, 9 et 16) |

## LIMITES DE L'ESSAI

1. Le système de test ZEUS IFA ANA HEp-2 est un outil d'aide au diagnostic pour usage en laboratoire et ne suffit pas pour poser un diagnostic définitif. Un résultat d'ANA positif peut être obtenu chez des personnes apparemment saines. Il est donc essentiel que les résultats soient interprétés par une autorité médicale compétente en tenant compte des informations cliniques globales du patient.
2. Les patients souffrant de LES suivant un traitement à base de stéroïdes peuvent avoir un résultat négatif.
3. Plusieurs médicaments d'usage courant vendus sous ordonnance peuvent créer des ANA (6, 7).
4. Il est possible qu'un motif d'anticorps cache complètement ou partiellement les caractéristiques de diagnostic d'un autre motif. Dans un tel cas, il sera nécessaire de titrer le sérum.
5. Ce produit ne vise pas à proposer une association définitive entre un motif de fluorescence nucléaire et un état de maladie quelconque.

## RÉSULTATS ESPÉRÉS

La valeur espérée dans une population normale est un résultat négatif, c'est-à-dire inférieur à 1:40. Il est cependant possible que des personnes apparemment saines aient des ANA dans leur sérum sanguin (36). Ce pourcentage augmente avec l'âge, particulièrement après 70 ans.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Le système de test ZEUS IFA ANA HEp-2 a été testé en parallèle avec une procédure de référence utilisant un substrat de foie de rat. Des tests d'ANA routiniers ont été effectués avec les deux procédures sur 434 spécimens de patients. Des 434 échantillons de sérum, 116 ont produit un résultat positif avec les deux procédures. Le système de test ZEUS IFA ANA HEp-2 a été en accord avec le résultat positif ou négatif dans 97 % des cas, avec une concordance parfaite (100 %) au niveau des motifs de marquage. Des 21 différences de résultats de titre, la procédure ZEUS IFA ANA HEp-2 a affiché une dilution de moins chez 18 spécimens. Cinq de ces 18 spécimens ayant produit un résultat négatif avec la procédure ZEUS IFA ANA HEp-2 ont obtenu un résultat positif à 1:20 avec la procédure de référence avec foie de rat.

## RÉFÉRENCES


1. Barnett EV:Mayo. Clin. Proc. 44:645, 1969.
2. Burnham TK, Fine G, Neblett TR:Ann. Int. Med. 63:9, 1966.
3. Casals SP, Friou GJ, Meyers LL:Arthritis Rheum. 7:379, 1964.
4. Condemi JJ, Barnett EV, Atwater EC, *et al*:Arthritis Rheum. 8:1080, 1965.
5. Dorsch CA, Gibbs CB, Stevens MB, Shelman LE:Ann. Rheum. Dis. 28:313, 1969.
6. Dubois EL:J. Rheum. 2:204, 1975.
7. Alarcon-Segovia D, Fishbein E:J. Rheum. 2:167, 1975.
8. Friou GJ:J. Clin. Invest. 36:890, 1957.
9. Friou GJ, Finch SC, Detre KD:J. Immunol. 80:324, 1958.
10. Coons AH, Creech H, Jones RN, *et al*:J. Immunol. 80:324, 1958.
11. Barnett EV, North AF, Condemi JJ, Jacox RF, Vaughn JH:Ann. Intern. Med. 63:100, 1965.
12. Lachman PJ, Kunkel HG:Lancet 2:436, 1961.
13. Friou GJ:Arthritis Rheum. 7:161, 1964.
14. Beck JS:Scot. Med. J. 8:373, 1963.
15. Anderson JR, Gray KG, Beck JS, *et al*: Ann. Rheum. Dis. 21:360, 1962.
16. Luciano A, Rothfield NF:Ann. Rheum. Dis. 32:337, 1973.
17. Harmon C, Deng JS, Peebles CL, *et al*: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 27:166-173, 1984.
18. Peebles CL, Molden DP, Klipple GL, Nakamura RM: An antibody to histone H3 which produces a variable large speckled (VLS) immunofluorescent pattern on mouse kidney. Arthritis Rheum. 27:S44, 1984.
19. Ritchie RF:Antinucleolar antibodies: Their frequency and diagnostic association. N. Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
20. Deng JS, Sontheimer RD, Gilliam JN: Relationships between antinuclear and anti-Ro/SS-A antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. J. Am. Acad. Dermatol. 11:494-499, 1984.
21. Meyer O, Hauptmann G, Tappeiner G, Ochs HD, Mascart-Lemone F: Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro(SSA) antibodies. Clin. Exp. Immunol. 62:678-684, 1985.
22. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M:Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti-Ro(SS-A) antibodies. Arthritis Rheum. 26:1279-1282, 1983.
23. Speirs C, Fielder AHL, Chapel H, *et al*:Complement system protein C4 and susceptibility to hydralazine-induced systemic lupus erythematosus. Lancet 1:922-924, 1989.
24. Watson RM, Scheel JN, Petri M, *et al*:Neonatal lupus erythematosus syndrome: Analysis of C4 allotypes and C4 genes in 18 families. Medicine 71:84-95, 1992.
25. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C:Arthritis Rheum. Vol. 23 No. 6:617, 1980.
26. Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, *et al*:N. Engl. J. Med. 263:769, 1960.
27. Pollack VE:N. Engl. J. Med. 271:165, 1964.
28. Raskin J:Arch. Derm. 89:569, 1964.
29. Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR:Lancet 2:1188, 1963.
30. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second edition; Approved Standard (1984). Published by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.
31. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
32. Beck JS:Lancet, 1:1203, 1961.
33. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM,*et al*:Am. J. Med. 52:48, 1972.

34. Burnham TK, Neblett TR, Fine G:Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
35. Textbook of Immunopathology, Vol II, P Miescher and HJ Muller-Eberhard (Eds), Glune & Stratton, NY, 1969.
36. Wittingham S. Irvin J, Mackay IR, *et al*:Aust. Ann. Med. 18:130, 1969.
37. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
38. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

**ZEUS Scientific, Inc.**
200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2
International: +1 908-526-3744
Fax: +1 908-526-2058
Website: www.zeusscientific.com

Si vous désirez une assistance clientèle aux États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.
Si vous avez besoin d'assistance technique aux États-Unis, veuillez contacter ZEUS Scientific au numéro de téléphone gratuit indiqué ou par courriel à support@zeusscientific.com.
Les clients ayant besoin d'assistance commerciale ou technique hors des États-Unis doivent contacter leur distributeur régional.

EC REP
**EMERGO EUROPE**
**Molenstraat 15**
**2513 BH, The Hague**
**The Netherlands**
**Tel: +31 (0)70 345 8570**
**Fax: +31 (0)70 346 7299**

ZEUS IFA et SAVe Diluent® sont des marques déposées de ZEUS Scientific, **© 2014 ZEUS Scientific, Inc. Tous droits réservés.**